

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО РЕЖИМА
НА КИНЕТИЧЕСКИЕ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ
ФЕРМЕНТА УРЕАЗЫ У ГЕЛЬМИНТОВ
ТЕПЛОКРОВНЫХ И ХОЛОДНОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ**

О. А. Шишова-Касаточкина, Т. Г. Колоскова, Л. И. Сохина

Лаборатория гельминтологии АН СССР, Москва

Проведено сравнительное исследование влияния температуры на константу скорости и энергию активации процесса расщепления мочевины (активности уреазы) у гельминтов млекопитающих (*Ascaris suum*) и рыб (*Contracaecum aduncum*). Было установлено различное поведение уреазы у этих гельминтов.

Среди различных условий температурный режим внешней среды играет важную роль в процессах адаптации гельминтов. С этой точки зрения исследование влияния температуры на активность ферментов у гельминтов от холоднокровных и теплокровных животных представляет несомненный интерес, поскольку адаптация животных к различным температурным режимам является одной из важнейших приспособительных реакций у организмов, обитающих в различных экологических условиях.

Многочисленные литературные данные, полученные на теплокровных животных, свидетельствуют о том, что при повышении температуры (как правило, до 45°) имеет место увеличение ферментативной активности и соответственно скорости процессов обмена. Однако существует температурный оптимум ферментативных процессов у животных, адаптированных к определенным условиям. Некоторые исследователи наблюдали различия в температурном оптимуме для ферментов с однотипным действием у различных позвоночных. Например, для фосфатазы, мальтазы пищеварительного тракта оптимум температуры у теплокровных (куры) выше, чем у холоднокровных (форель) (Уголев, 1972; Иезуитова и др., 1972).

Вместе с тем Коштойнцем и другими (1934) было показано, что температурный оптимум ферментативной активности не совпадает с температурными условиями существования животных. В работах Хохака и Сомеро (Hochacka and Somero, 1968), Ньюэлла (Newell, 1961) также высказывается точка зрения, что активность некоторых ферментов, например лактатдегидрогеназы, не коррелирует с температурой среды обитания организма (рыбы различных акваторий). Большое значение имеет концентрация субстрата. В условиях ограниченного количества субстрата скорость обмена не зависит от температуры среды обитания животного.

Однако оптимальные кинетические и термодинамические характеристики некоторых ферментов эритроцитов и пищеварительного тракта позвоночных (например, энергия активации) соответствуют области температур, близких к температуре тела животного (Buruiana, Nadarag, 1961; Уголев, 1972; Иезуитова, Уголев и др., 1972).

В серии работ Вернберг (Vernberg, 1961, 1966, 1967) показано, что личинки трематод от улитки (*Nassarius obsoleta*) и взрослые формы тех же трематод, паразитирующих у птиц (*Himasthla quissetensis*) и рыб (*Zoogon rubellus*), по-разному реагируют на изменения температуры. Исследо-

ватели изучали выживаемость и поглощение кислорода. У личинок трематод рыб скорость поглощения кислорода возрастает с повышением температуры до 18°, при дальнейшем повышении температуры скорость дыхания не увеличивается, а после 36° даже снижается, у личинок паразитов птиц скорость поглощения кислорода повышалась при содержании их в среде с температурой до 41°. Указанные авторы считают, что личиночные формы преадаптированы к будущему хозяину. Предполагается, что механизм управления температурной устойчивостью генетического характера.

Для гельминтов температурные зависимости ферментативных процессов не исследованы, тем не менее эти вопросы важны для понимания взаимоотношений гельминт—хозяин и, вероятно, имеют отношение к пониманию явления специфичности.

В этом отношении представляет интерес исследование процессов уреогенеза и пуриколиза, в частности фермента уреазы у нематод от различных классов позвоночных, поскольку известна роль уреогенеза и пуриколиза в адаптации животных к среде обитания (Baldwin, 1948; Brown, Cohen, 1958; Florkin, 1966; Weber, 1967; Флоркэн, 1947).

Исследования ферментов, образующих мочевины и расщепляющих ее у паразитических и свободноживущих нематод, весьма ограничены, и, в частности, отсутствуют данные по нематодам рыб. Этот вопрос представляет интерес с точки зрения выявления зависимости белкового обмена гельминтов от особенностей и своеобразия обмена хозяина, поскольку известно, что конечные продукты белкового обмена у птиц отличаются по химической природе от таковых у млекопитающих. В частности, у птиц мочевиная кислота является конечным продуктом распада белка и пуринов. Известно также, что у млекопитающих наблюдается более высокая дифференциация продуктов обмена белков: азот аминокислот выделяется в виде мочевины, пуриновые основания превращаются в мочевую кислоту и аллантоин. У морских рыб в результате белкового и пуринового обмена образуется в преобладающем количестве мочевины, а у пресноводных рыб в основном — аммиак и в меньшей степени мочевины.

Ранее (Шишова-Касаточкина и др., 1974) показано, что нематоды адаптированы к своеобразию обмена хозяина. Например, нематоды морских рыб (*Contracaecum aduncum*) продуцируют и накапливают мочевины в значительно больших количествах по сравнению с нематодами птиц и млекопитающих. Известно значительное влияние температурных режимов внешней среды на активность некоторых ферментов. В этом плане ферменты орнитинового цикла и уреазы не исследованы.

Для обобщения данных необходима количественная оценка активности уреазы у нематод различных групп. Целью настоящей работы являлась кинетическая и термодинамическая оценка активности уреазы у нематод (*A. suum* и *C. aduncum*). Проводились определение константы скорости процесса расщепления мочевины и исследование температурной зависимости (энергии активации) активности уреазы у нематод от холоднокровных и теплокровных животных.

Активность уреазы определялась методом, описанным нами ранее (1974), за следующие интервалы времени: 30, 60, 90 и 120 мин. Исследование активности проводилось при различных температурах (17, 27, 37, 47°).

Расчеты константы скорости для мономолекулярного процесса проводились по формуле

$$K_{\text{ск}} = \frac{2.3}{t} \lg \frac{C_0}{C_0 - C_1},$$

где C_0 — исходная концентрация мочевины; C_1 — количество расщепленной мочевины; t — время.

Энергия активации рассчитывалась по формуле

$$E = \frac{4.6 T_2 \cdot T_1}{T_2 - T_1} \lg \frac{K_2}{K_1},$$

где E — энергия активации; T_2 — более высокая температура (по Кельвину); T_1 — более низкая температура; K_1 — константа скорости при T_1 ; K_2 — константа скорости при T_2 .

Результаты исследования показали, что скорость реакции расщепления мочевины возрастает при повышении температуры независимо от температурного режима среды обитания (табл. 1). У аскарид активность уреазы значительно ниже, чем у контрацекумов. Так, у аскарид при температуре ниже 27° процесс практически не идет. У контрацекумов активность уреазы с понижением температуры снижается незначительно, однако при повышении температуры до 47° она не возрастает. У нематод млекопитающих активность фермента значительно возрастает с повышением температуры.

Т а б л и ц а 1
Константа скорости
процесса расщепления мочевины
(активность фермента уреазы)
у нематод млекопитающих
и морских рыб

Температура (в $^\circ\text{C}$)	Константы скоростей	
	аскариды от свиньи	контрацекумы от трески
17	Реакция практически не идет	1.08×10^{-3}
27	1.33×10^{-4}	1.32×10^{-3}
37	3.28×10^{-4}	2.31×10^{-3}
47	14.8×10^{-4}	Практически не повышается

Т а б л и ц а 2
Энергия активации
для процесса расщепления мочевины
(активность фермента уреазы)
у нематод млекопитающих
и морских рыб

Интервалы температур (в $^\circ\text{C}$)	Энергия активации (в кал./моль)	
	аскариды от свиньи	контрацекумы от трески
17—20	—	5.280
17—37	—	6.784
27—37	13.880	9.800
37—47	29.976	—
27—47	—	7.247

Примечание. Взяты средние данные из 10 опытов для каждого времени.

В результате нашего исследования показано, что скорость расщепления мочевины под влиянием уреазы у нематод от трески более чем на порядок выше, чем у нематод млекопитающих. При температуре 17° скорости процесса у контрацекумов изменяются незначительно, в то время как у аскарид этот процесс при такой температуре практически не идет.

Таким образом, было установлено, что температурный оптимум для уреазы у аскарид выше, чем у контрацекумов. При этом необходимо отметить, что фермент уреазы как у рыб, так и у млекопитающих отсутствует.

Полученные нами данные свидетельствуют о сложной температурной зависимости ферментативного процесса у паразитических нематод. С одной стороны, температурный оптимум активности уреазы не соответствует температурным условиям, в которых обитают нематоды, с другой стороны, наблюдаются определенные различия в активности этого фермента у нематод теплокровных и холоднокровных животных.

Дальнейшее исследование температурных функций уреазы у нематод от свиньи и нематоды от трески и последующие расчеты энергии активации показали, что вполне вероятно адаптация к определенным температурным условиям функционирования ферментов.

Расчет и определение энергии активации процесса расщепления мочевины у нематод показывают, что у аскарид эта величина равна 13.880 кал./моль в интервале температур $37-27^\circ$ (табл. 2). Высокие величины энергии активации указывают на низкую эффективность и трудность течения процесса. У контрацекумов энергия активации ниже — 9.800 кал./моль в тех же интервалах температур (табл. 2). При более низких температурах она снижается до 6.784. Таким образом, эффективность процесса, катализируемого уреазой у нематод рыб, с понижением температуры повышается.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наши данные об отсутствии корреляции температурного оптимума активности уреазы с температурным режимом среды обитания нематод, с одной стороны, и, с другой стороны, данные о высокой скорости процесса расщепления мочевины у нематод холоднокровных по сравнению с нематодами теплокровных животных согласуются с результатами, полученными на ферментах позвоночных, существующих в различных температурных режимах. Рядом исследователей было показано, что температурный оптимум для некоторых ферментов не совпадает с температурными условиями обитания позвоночных животных (Коштоянц и сотр., 1934; Иезуитова и др., 1972; Newell, 1961; Hochacka, Somero, 1968). Указанные авторы, изучавшие влияние естественных температурных условий на активность ферментов пищеварительного тракта у теплокровных и холоднокровных животных, не исследовали активность уреазы. Однако мы имеем основание говорить о том, что тенденция изменения ее активности у гельминтов в зависимости от температуры аналогична изменениям активности других ферментов у теплокровных и холоднокровных позвоночных животных.

Высокая активность уреазы, которая незначительно уменьшается с понижением температуры, свидетельствует о специфической роли процесса расщепления мочевины у контрацекумов в отличие от аскарид.

Интенсивное продуцирование хозяином мочевины имеет различное функциональное значение: мочевина у рыб играет значительную роль в осуществлении процессов осморегуляции, возможно, аналогичную роль это вещество выполняет и у нематод рыб.

У млекопитающих мочевина (конечный продукт обмена белка) выводится из организма как менее токсичный продукт и не является веществом, необходимым для жизнедеятельности. У нематод млекопитающих процесс осморегуляции в условиях осмотического стресса осуществляется за счет синтеза аминокислот (Бердыева, Шишова-Касаточкина, 1974). У нематод млекопитающих обнаружено незначительное количество мочевины в тканях, в отличие от нематод рыб.

Возможно, избыток мочевины у рыб создает неблагоприятную гипертоническую среду для гельминтов, и механизмом, регулирующим тоничность среды, является удаление мочевины посредством активного ее расщепления под влиянием уреазы.

Мы обнаружили уменьшение энергии активации для реакции, катализируемой уреазой у нематод рыб в зоне более низких температур. Таким образом, у нематод рыб оптимальные термодинамические и кинетические характеристики соответствуют зоне более низких температур.

Аналогичные изменения энергии активации для мальтазы и фосфатазы наблюдались для теплокровных и холоднокровных позвоночных животных (Уголев, 1972; Иезуитова и др., 1972; Buguiana, Nadarag, 1961).

Известно, что высокая эффективность процесса характеризуется низкой величиной энергии активации, при этом скорость реакции мало изменяется в зависимости от температуры. Значительное изменение константы скорости с изменением температуры наблюдается для реакций, в которых энергия активации высока. В наших экспериментах показано, что константа скорости у нематод рыб мало изменяется в зависимости от температуры и энергия активации при низких температурах (27, 17°) невысока.

Наоборот, малая скорость процесса расщепления мочевины у нематоды млекопитающих согласуется с высоким значением величины энергии активации. В интервале температур 37—47° скорость процесса расщепления мочевины значительно возрастает и энергия активации высока. В данном случае это может быть связано с денатурационными процессами (при 47°) белка-фермента, поскольку известно значительное возрастание энергии активации (при температуре около 50° до 100.000 кал./моль) при термической денатурации и деструкции ряда ферментов. При этом константа скорости сильно возрастает с повышением температуры: изменяются энер-

гетическая эффективность процесса и его механизмы (Нейрат, Бейли, 1956).

Учитывая наблюдаемую нами высокую скорость процесса расщепления мочевины и уменьшение энергии активации в зоне низких температур, можно предположить наличие активаторов фермента уреазы у нематод холоднокровных животных как регулирующий механизм ферментативного действия в специфических экологических условиях. Это предположение вполне вероятно, поскольку нами обнаружены активаторы уреазы у ряда цестод рыб.

Результаты исследования влияния температурных условий на активность уреазы у нематод теплокровных и холоднокровных животных, с одной стороны, позволяют говорить о существовании адаптированности гельминтов к температурным функциям и энергетической эффективности ферментативных процессов хозяина. С другой стороны, кинетические исследования свидетельствуют о специфической роли уреазы у нематод рыб. Такая высокая активность, очевидно, играет роль в процессе адаптации нематод к условиям обитания в среде со значительным продуцированием мочевины.

Л и т е р а т у р а

- Б е р д ы е в а Г. Т., Ш и ш о в а - К а с а т о ч к и н а О. А. 1974. Роль аминокислот в осуществлении функции осморегуляции у *Ascaris suum*. Тр. ГЕЛАН СССР, 24 : 19—25.
- И з у и т о в а Н. Н., Т и м о ф е е в а Н. М., Ч е р н я х о в с к а я М. Ю., Е г о р о в а В. В., Т у л я г а н о в а Е. Х., Щ е р б а к о в Г. Г., Ц в е т к о в а В. А., У г о л е в А. М. 1972. Влияние высоких и низких температур на активность ферментов, обеспечивающих мембранное и полостное пищеварение. Сб. научных трудов Одесского сельхоз. инст. : 10—12.
- К о ш т о я н ц Х. С., К о р ж у е в П. А. 1934. Трипсин холоднокровных и теплокровных животных. Температурный оптимум и теплоустойчивость его. Зоол. журн., 13 : 71—82.
- Н е й р а т Г., Б е й л и К. 1956. Белки, т. 2. Физико-химия белковых веществ. Изд. ИЛ, М. : 664, 667—668.
- У г о л е в А. М. 1972. Мембранное пищеварение. Изд. «Наука», Л. : 70—74.
- Ф л о р к э н М. 1947. Биохимическая эволюция. Изд. ИЛ, М. : 67—111.
- Ш и ш о в а - К а с а т о ч к и н а О. А., С о х и н а Л. И., А б р а м о в а Т. Г. 1974. Роль образования мочевины и активности фермента уреазы у нематод различных классов позвоночных в процессе адаптации к хозяину. Тр. ГЕЛАН СССР, 24 : 250—255.
- B a l d w i n E. 1948. Dynamic aspects of biochemistry.
- B r o w n G. W., C o h e n P. P. 1958. In McElroy W. D. et Glass B., Symposium on the Chemical Basis of Development. Baltimore, Johns. Hopkins, edit : 495—513.
- B u r u i a n a L. M., H a d a r a g E. 1961. Modification adaptives de la monoesterase acide e'rythrocytaire pendent l'evolution philogenetique. Naturwissenschaften, 48 (9) : 379.
- F l o r k i n M. 1966. Aspects moleculaires de l'adaptation et de la phylogenie. Masson et Cie, Editeurs, Paris : 246.
- H o c h a c h k a P. W., S o m e r o G. N. 1968. The adaptation of enzymes to temperature. Compar. Biochem. and Physiol., 27 (3) : 659—668.
- N e w e l l R. C. 1961. Effect of temperature on the metabolism of poikilotherms. Nature, London, 212 : 426—428.
- V e r n b e r g F. J., V e r n b e r g W. B. 1966. Interrelationship between parasites and their hosts. II. Comparative metabolic patterns of thermal acclimation of the trematode *Lintonium vibex* with its host *Spheroides maculatus*. Exptl. Parasitol., 18 (2) : 244—250.
- V e r n b e r g W. B. 1961. Studies on oxygen consumption in digenetic trematodes. VI. The influence of temperature on larval trematodes. Exptl. Parasitolog., 11 (2—3) : 270—275.
- V e r n b e r g W. B., V e r n b e r g F. J. 1967. Interrelationships between parasites and their hosts. III. Effect of larval trematodes of the thermal metabolic response of their Molluscan host. Exptl. Parasitolog., 20 (2) : 225—231.
- W e b e r R. 1967. Comprehensive Biochemistry. M. Florkin, chapter V, volume 28. Amsterdam—London—New York : 145—195.

THE EFFECT OF A TEMPERATURE REGIME
ON KINETIC AND THERMODYNAMIC FUNCTIONS OF THE UREASE
FERMENT IN HELMINTHS OF WARM-BLOODED
AND COLD-BLOODED ANIMALS

O. A. Shishova-Kasatochkina, T. G. Koloskova, L. I. Sokhina

S U M M A R Y

The determination of the constant of the urea fission rate and study of the temperature dependence (activation energy) of the urease activity on warm- and cold-blooded animals in *Ascaris suum* and *Contracaecum aduncum* were undertaken.

It has been shown that the constant of the urea fission rate in *C. aduncum* is more than an order of magnitude higher than that in *A. suum*. At a temperature of 17° the rate of this process in *C. aduncum* changes but little while in *A. suum* it practically ceases. On the contrary, at 47° the urease ferment activity in *A. suum* increases considerably while in *C. aduncum* the process rate does not rise as compared to that at 37°. The subsequent calculations of the energy activation have shown that a certain adaptation to definite conditions of ferments functioning can take place.
